

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

Котик Олени Адамівни

***«Електрофізіологічні властивості катіонних каналів великої
провідності та інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів
ядерної мембрани кардіоміоцитів»***

**представлену на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних
наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин**

Актуальність проведених досліджень

Білки, що формують іонні канали мембран, зараз визначені як найбільший клас молекулярних мішеней для дії лікарських препаратів (Santos et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2017). Фармакологічні модулятори активності іонних каналів (як активатори, так і інгібітори) демонструють свою ефективність у лікуванні таких поширених захворювань як епілепсія, серцеві аритмії, гіпертонічна хвороба, хронічний біль, неонатальний цукровий діабет, міопатії та багатьох інших. У той же час як теоретичні знання, так і галузі їх практичного застосування на сьогодні стосуються головним чином іонних каналів, що експресовані у плазматичній мембрані, а також мембрані ендо(сарко)плазматичного ретикулуму різних типів клітин, тоді як біофізична і фармакологічна характеристика, а також наші знання щодо функціональної ролі іонних каналів інших внутрішньоклітинних органел залишаються досить фрагментарними.

В Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в лабораторії д.б.н. Марченка С.М., а пізніше к.б.н. Котлярової А.-М.Б. в останні 15 років були започатковані і активно досліджуються властивості іонних каналів ядерної мембрани нейронів і кардіоміоцитів. Дисертаційна робота Котик О.А. по своїй суті є логічним продовженням і

подальшим розвитком цих піонерських робіт у напрямку комплексного дослідження двох типів іонних каналів, що експресовані у мембранах ядер кардіоміоцитів, а саме катіонних каналів великої провідності (так звані LCC канали) та інозитол-1,4,5-трисфосфатних рецепторів (InsP₃R). Відомо, що обидва типи цих каналних/рецепторних білків відіграють ключову роль в генерації внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів, а в контексті цього дослідження це поширюється також і на кальцієву динаміку у нуклеоплазмі, що має безпосереднє відношення до регуляції транскрипції генів. Таким чином, робота Котик О.А. відповідає актуальним напрямкам сучасних біомедичних досліджень, а її значність має як теоретичні, так і практичні складові.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

В процесі виконання дисертаційного дослідження автором були отримані цілий ряд нових даних, або таких, що суттєво доповнюють існуючи уявлення щодо експресії, біофізичних та фармакологічних властивостей LCC-каналів та InsP₃ рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів, що в свою чергу створює теоретичне підґрунтя для передбачення функціональної ролі цих іон-транспортних шляхів та їх практичного застосування для корекції певних патофізіологічних станів міокарду, що зумовлені порушеннями кальцієвої сигналізації в цих клітинах.

Зокрема в роботі були вперше продемонстровані:

- наявність катіон-селективних іонних каналів з різною провідністю, в діапазоні від 10 до 340 пСм, у нативних ядерних мембранах кардіоміоцитів щурів;

- серед цих каналів найбільша увага була приділена дослідженню біофізичних властивостей та іонної селективності LCC каналів великої провідності (у середньому 209 пСм);
- з метою фармакологічної ідентифікації цих каналів вперше була досліджена дія на функціональну активність LCC-каналів широкого спектру сполук – потенційних фармакологічних модулаторів цих каналів – від агоністів та антагоністів нікотинових холіноцепторів (DhβE, dFBr, тубокурарин, атракуріум, піпекуронію бромід, рокуронію бромід, гексаметоній, дитилін, MLA, α-конотоксин PeIA, нікотин, PNU 282987 та карбахолін) і до ряду природних токсинів (нейротоксин II, α-кобратоксин): серед них найбільш ефективним антагоністом виявився DhβE;
- паралельно з дослідженням катіонних каналів в ядерних мембранах були ідентифіковані два типи інозитол-1,4,5-трисфосфатних рецепторів з різною чутливістю до іонів кальцію. Дотепер InsP₃ рецептори трьох типів були досліджені переважно в мембранах ендо(сарко)плазматичного ретикулуму, а їх властивості у нуклеарній мембрані виявились досить унікальними.

Практичне значення отриманих результатів, як вже зазначалось вище, у найбільшій мірі може стосуватися проблематики серцевих розладів та захворювань, які є найбільш поширеною причиною смертності в усьому світі. Однак слід зауважити, що дане дисертаційне дослідження носить переважно фундаментальний характер і не містить певних рекомендацій щодо практичного застосування отриманих результатів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Для виконання даної роботи було адаптовано та оптимізовано метод ізоляції інтактних ядер кардіоміоцитів, що придатні для

електрофізіологічних досліджень. Наукові положення дисертаційної роботи базуються на широкому застосуванні методу петч-клемп в конфігураціях “nucleus-attached” та “excised patch”, що є найбільш прямим і адекватним методом для дослідження іонних каналів. Більше того, на відміну від реєстрацій інтегральних струмів реєстрація активності поодиноких іонних каналів дозволяє проводити такі дослідження на найбільш фундаментальному рівні і, таким чином, отримувати прямі дані щодо провідності, селективності і ймовірності знаходження іонного каналу у відкритому стані, як це і було зроблено у цій роботі. Крім того, електрофізіологічні дані були також доповнені імуноцитохімічним аналізом.

Висновки по кожній серії проведених експериментів базуються на достатній кількості вимірів, їх адекватному статистичному аналізу і обговоренні. Загалом Котик О.А показала себе компетентним науковцем, хто засвоїла технічно дуже складний метод реєстрації та аналізу активності поодиноких іонних каналів у ядерній мембрані, вона добре обізнана з науковою літературою по досліджуваній нею проблемі і здатна до критичного аналізу отриманих результатів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано згідно з планами науково-дослідних робіт Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в рамках 3-х наукових тем, а також частково за підтримки грантів Президента України для молодих вчених за конкурсними проектами 2017 і 2018 років.

Структура і обсяг дисертації

Дисертаційна робота Котик О.А. представлена за загально-прийнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 153 сторінках (з них основний зміст становить 109

сторінок), що включає в себе анотацію, список наукових праць по темі дослідження, вступ, огляд літературних даних, опис матеріалів і методів досліджень, результати власних досліджень та їх обговорення, висновки та список цитованої літератури (207 джерел). Отримані результати проілюстровані 60 рисунками, які дають цілісне уявлення як про значну кількість, так і високу якість експериментів. Крім того, робота містить цікаву і інформативну схему, яка ілюструє підсумки дослідження шляхів транспорту іонів через ядерну мембрану кардіоміоцитів та допомагає краще оцінити суть отриманих результатів і їх взаємозв'язок в різних частинах цього дослідження.

У вступі окреслено коло питань стосовно експресії та функції іонних каналів у ядерній мембрані, на основі чого обґрунтовано вибір теми дослідження, чітко сформульовано мету та завдання дослідження, пояснено зв'язок роботи з науковими програмами Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де вона виконувалася, зазначено наукову новизну, теоретичне та практичне значення цього дослідження, а також представлені відомості щодо особистого внеску здобувачки і апробації матеріалів дисертаційного дослідження.

В розділі 1 (Огляд літератури) автор висвітлює сучасний стан досліджуваної проблематики. Він містить 4 підрозділи, в яких автор послідовно розглядає питання структурно-функціональної організації ядер еукаріотів, вже досліджених іон-транспортувальних систем ядерної мембрани, ролі ядерної оболонки як депо кальцію, а також молекулярної будови і властивостей InsP_3 рецепторів. Весь наведений аналіз літературних джерел має безпосереднє відношення до теми дисертаційної роботи.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) пояснено метод ізоляції інтактних ядер кардіоміоцитів щурів, що був оптимізований для їх подальшого електрофізіологічного дослідження, використані

конфігурації петч-клемп методу та молекулярної детекції експресії InsP_3 рецепторів другого типу. Всі експериментальні методи, а також математична і статистична обробка отриманих даних є адекватними меті і завданням дослідження.

В розділі 3 (Результати та їх обговорення) наведені основні результати досліджень. У логічній послідовності автор переходить від ідентифікації трьох різних типів (на основі їх амплітудно-кінетичних характеристик) катіонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів до більш детального аналізу LCC каналів великої провідності як таких, які мають найбільшу щільність експресії, що разом з високою провідністю очевидно визначає саме цей тип катіонних каналів як найбільш фізіологічно значущий. Далі, у другому підрозділі, наведено детальний аналіз InsP_3 рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів. З точки зору визнаної ролі цих рецепторів у формуванні внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів ця частина роботи є принципово важливою. Привертає увагу значна кількість рисунків, які детально ілюструють кожен етап дослідження та свідчать про високу якість реєстрацій активності тих чи інших типів іонних каналів.

Висновки роботи сформульовані чітко, вони відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Представлені у дисертаційній роботі результати опубліковані у 25 статтях та тезах конференцій. Вони широко доповідались на наукових форумах, серед яких варто відмітити з'їзди Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка, Українського товариства нейронаук, Українського біофізичного товариства, а також більш спеціалізовані міжнародні конференції у Німеччині і Польщі.

В авторефераті дисертаційної роботи по кожному розділу викладені і проілюстровані основні результати, зроблені висновки, а в анотації роботи стисло викладена її суть.

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли наступні **запитання та зауваження:**

1. Оскільки активність LCC каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів пригнічувалась як агоністами, так і антагоністами нікотинових холінорецепторів і на неї не впливав карбахолін, чи можна було б зробити висновок про те, що LCC канали структурно відмінні принаймні від nAChR? Цікаво також, чи можна на основі отриманого масиву даних (центральними є біофізичний «підпис» - спонтанна пачечна активність, провідність, селективність, потенціалзалежність, а також фармакологічний профіль LCC) хоча б гіпотетично визначити молекулярну природу LCC?
2. При дослідженні селективності LCC каналів один з розчинів, що містив 100 ммоль/л CaCl_2 , був гіпертонічним, тому виникає питання як це впливало на стан ядра, особливо в конфігурації “nucleus-attached”.
3. Зазначається, що «Концентрацію вільного Ca^{2+} розраховували за допомогою програми Maxchelator», при цьому важливо було б вказати загальну концентрацію Ca^{2+} , адже від цього залежить буферна ємність розчину.
4. Методи: варто було б окремо протестувати та зазначити швидкість зміни розчину, адже в роботі широко використовувався фармакологічний аналіз.
5. У рівнянні 2.3 пропущено знак «=», « t_i – ймовірність того, що і каналів з N відкрито»: насправді t_i це не ймовірність, а сумарний час одночасного відкривання $j=1,2,3...N$ каналів.

6. Зазначається, що LCC-канали «характеризуються повільною кінетикою» (Рис. 3.2 та с. 63), тоді як в кінетичній структурі каналі є очевидними серії швидких закривань та відкривань, відомих як «пачечна» (“bursts”) активність, тому краще було б описувати цю активність саме як пачечну, а для її кількісної характеристики варто було б додатково використати і такі важливі параметри, як середня кількість відкривань на одну «пачку» та середній інтервал часу між «пачками».
7. В роботі досліджувалась дія різних фармакологічних модуляторів іонних каналів в різних концентраціях, що дає можливість побудувати криві концентраційних залежностей та проаналізувати дані в термінах величин IC_{50} або ж EC_{50} , як це загальноприйнято при фармакологічному аналізі. Це зокрема стосується залежності Po $InsP_3$ рецепторів від концентрації $InsP_3$ (Рис. 3.40), а визначення EC_{50} для дії $InsP_3$ дало б змогу провести більш кількісні порівняння з іншими дослідженнями.
8. В роботі трапляються деякі неточності або невдачі термінів: холінорецептори (загальноприйнято холіноцептори); інозитол-1,4,5-трифосфат (відповідно до англійського еквівалента це інозитол-1,4,5-трисфосфат); невдалим є термін «Імуногістохімічна ідентифікація IP_3R_2 » у ядерній мембрані кардіоміоцитів, коли досліджувались не тканини, а ізольовані ядра; «амплітудні діаграми» - краще амплітудні гістограми; оскільки LCC непроникні для Ca^{2+} невдалим є підпис до Рис. 3.4 «Приклад реєстрації Ca^{2+} -струму через LCC-подібний канал при заміні розчину у піпетці на розчин $CaCl_2$ », тощо.

Висловлені зауваження та пропозиції до можливих подальших досліджень суттєво не впливають на загалом високу оцінку даної дисертаційної роботи.

Висновок:

Згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, теоретичною та практичною значністю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, а також перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота Котик Олени Адамівни *«Електрофізіологічні властивості катіонних каналів великої провідності та інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів»*, відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент

завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики

ННЦ "Інститут біології та медицини"

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка,

доктор біологічних наук, професор Жолос О.В.

